

# **Trabalho de Conclusão de Curso**

**Avaliação da expressão das  
metaloproteinases de matriz -2 e -9 em  
queilites actínicas e carcinomas  
epidermóides de lábio**

**Fernanda Marcello Scotti**



**Universidade Federal de Santa Catarina  
Curso de Graduação em Odontologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Fernanda Marcello Scotti

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES  
DE MATRIZ -2 E -9 EM QUEILITES ACTÍNICAS E  
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LÁBIO**

Trabalho apresentado à Universidade  
Federal de Santa Catarina, como  
requisito para a conclusão do Curso de  
Graduação em Odontologia  
Orientador: Prof. Dr. Filipe Modolo  
Siqueira  
Co-orientador: Profa. Dra. Michelle  
Tillmann Biz

Florianópolis  
2014

Fernanda Marcello Scotti

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES  
DE MATRIZ -2 E -9 EM QUEILITES ACTÍNICAS E  
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LÁBIO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 14 de novembro de 2014.

**Banca Examinadora:**

---

Prof., Dr. Filipe Modolo Siqueira,  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof., Dr. Felipe Perozzo Daltoé,  
Membro  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Karin Berria Tomazelli,  
Membro  
Universidade Federal de Santa Catarina



Dedico este trabalho a Deus, meus  
pais, professores e amigos.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por minha vida, minha família e amigos. Por permitir que eu tivesse saúde, força para superar todas as dificuldades e chegar até aqui, o primeiro passo da minha futura independência.

A esta Universidade, na qual deposito total confiança no mérito e ética presentes, que muito me orgulha, por seu corpo docente e discente que me deram a oportunidade de vivenciar esses cinco anos de muito aprendizado.

Ao Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira pela oportunidade de participar desse trabalho, pelo suporte na elaboração do mesmo e por fazer eu acreditar no meu potencial.

A mestranda Bianca Carla Bianco por ter realizado as reações de imuno-histoquímica do nosso trabalho, pelo apoio e por ajudar na elaboração deste.

Ao Prof. Dr. Felipe Perozzo Daltoé por aceitar participar da minha banca.

A mestranda Karin Tomazelli por aceitar ser minha suplente.

A Prof. Renata Goulart Castro por realizar a análise estatística.

Agradeço aos meus pais simplesmente por tudo que eu tenho e sou. Por estar do meu lado em todos os momentos, me apoiarem e incentivarem minhas escolhas.

Agradeço aos meus amigos por existirem, pela amizade que estive presente durante a minha formação e que continuará presente na minha vida com certeza.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

Não há dúvidas que a capacidade de invadir os tecidos e constituir colônias de células em sítios remotos é característica de neoplasia maligna.

(KOWALSKI et al, 2005)





## RESUMO

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases, enzimas proteolíticas capazes de degradar componentes da membrana basal (MB) e da matriz extracelular (MEC). Este estudo teve como objetivo investigar o papel das MMP -2 e -9 no comportamento biológico da Queilite Actínica (QA) e Carcinoma Epidermóide de Lábio (CEL), por meio de reação de imuno-histoquímica. Para tal, vinte casos de QA, vinte casos de CEL e vinte casos de mucosa labial normal (MLN) foram selecionados a partir de arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina. Para cada lesão foram obtidos cortes seriados de 3µm de espessura dos respectivos blocos de parafina. Foi realizada a reação de imuno-histoquímica pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase para a avaliação dos antígenos MMP-2 e MMP-9. A avaliação da imunorreatividade foi feita por 2 examinadores, avaliando células negativas e positivas. A análise de dados revelou maior expressão imuno-histoquímica de MMP-2 em QA quando comparado com CEL (53,96% e 43,85,% respectivamente) e também maior expressão imuno-histoquímica de MMP-9 em QA quando comparado com CEL (54,21% e 27,74% respectivamente) porém sem significância estatística quando comparados os grupos. Com base na observação da média de células marcadas em cada uma das lesões, concluiu-se que as MMPs estudadas podem estar correlacionadas com a transformação da lesão pré-maligna em maligna.

**Palavras-chave:** metaloproteinases de matriz, queilite actínica, carcinoma epidermóide de lábio.



## ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of endopeptidases, proteolytic enzymes capable of degrading components of the basement membrane (BM), extracellular matrix (ECM). The aim of this study was to investigate the role of MMPs -2 and -9 in the biological behavior of actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma, through immunohistochemistry. Twenty cases of actinic cheilitis, twenty cases of lip squamous cell carcinoma and twenty cases of normal mucosa were selected from the archives of the Oral Pathology Laboratory at the Federal University of Santa Catarina. 3µm serial sections were obtained and submitted to the streptavidin-biotin-peroxidase immunohistochemical method for the evaluation of MMP-2 and MMP-9 antigens. Evaluation of immunoreactivity was performed by two observers by evaluating positive and negative cells. Data analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Student's t test. Results showed higher immunohistochemical expression of MMP-2 in actinic cheilitis when compared with lip squamous cell carcinoma (53.96 and 43.85%, respectively) and also higher immunohistochemical expression of MMP-9 in actinic cheilitis when compared with lip squamous cell carcinoma (54.21% and 27.74%, respectively) but without statistical significance when compared the groups. Based on this observation, it was concluded that the matrix metalloproteinases studied could participate in the transformation of premalignant to malignant lesion.

**Keywords:** matrix metalloproteinases, actinic cheilitis, lip squamous cell carcinoma.



## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Expressão imuno-histoquímica das MMPs.....	43
---	----

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Intensidade da imunomarcção .....	40
Tabela 2- Porcentagem da imunomarcção.....	41





## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CE – Carcinoma epidermóide;  
CEL – Carcinoma Epidermóide de Lábio;  
UV – Radiação Ultra-Violeta;  
QA – Queilite Actínica;  
MB – Membrana Basal;  
MEC – Matriz Extracelular;  
MMP - Metaloproteinase de Matriz;  
MLN – Mucosa Labial Normal;  
LPB/UFSC – Laboratório de Patologia Bucal – UFSC;  
PBS – Phosphate–buffered saline;  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina;  
HE – Hematoxilina e Eosina;  
CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos.



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu$  - micrometro;  
 $\alpha$  – alfa.



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>3 5</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Delineamento do estudo .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Aspectos Éticos.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3</b>	<b>Seleção do material de estudo.....</b>	<b>36</b>
<b>3.4</b>	<b>Procedimentos Laboratoriais.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5</b>	<b>Avaliação da Imunorreatividade.....</b>	<b>38</b>
<b>3.6</b>	<b>Análise dos Dados.....</b>	<b>39</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>MMP-2.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>MMP-9.....</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>
	<b>ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP SH.....</b>	<b>56</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide de lábio (CEL) é uma enfermidade de grande relevância no Brasil, por ser um país tropical com elevada incidência de radiação ultravioleta (UV) (SENA et al, 2010) e onde a população se expõe constantemente ao sol tanto na área rural quanto urbana devido, principalmente, à ocupação profissional (PRADO, PASSARELLI, 2009). Este câncer corresponde a 30% das neoplasias malignas da boca nas regiões tropicais (KORNEVS et al, 2005) e, juntamente com os cânceres intra-orais, soma 40% dos cânceres de cabeça e pescoço (VIEIRA et al, 2012).

A exposição crônica à radiação UV pode levar a alterações genótípicas e fenotípicas das células epiteliais, genericamente chamadas de atipias ou displasias epiteliais e que podem ser consideradas alterações pré-malignas. Dentre estas alterações, destacam-se as alterações no ciclo celular e nos mecanismos de apoptose, que podem levar à formação do Carcinoma Epidermóide (CE) (OUHITIT et al, 2000).

O CEL é precedido pela queilite actínica (QA), uma lesão potencialmente malignizável, ou seja, que apresenta um risco aumentado de apresentar crescimento celular desordenado e evoluir para CE (KAUGARS et al, 1999; SANTOS et al, 2003; SILVERMAN, EVERSOLE, TRUELOVE, 2004; MARTINEZ et al, 2005; CURY et al, 2007).

As lesões potencialmente malignizáveis normalmente são portadoras de displasias epiteliais e sabe-se que a presença delas estão

associadas ao aumento de 10 a 20% do risco para desenvolvimento de CE (SANTOS et al, 2003).

A QA é resultante da exposição crônica e prolongada à radiação UV, tem predileção pelo gênero masculino, proporção homem-mulher de cerca de 10:1 , acometendo principalmente leucodermas, com idade entre sexta a sétima décadas de vida, uma vez que danos causados pela radiação solar se acumulam ao longo dos anos (KAUGARS et al, 1999; SANTOS et al, 2003; MARTINEZ et al, 2005; CURY et al, 2007; VIEIRA et al, 2012; NEVILLE et al, 2009; SILVA et al, 2006). Afeta, em 95% dos casos, o lábio inferior (VIEIRA et al, 2012). Em comparação com a pele, que apresenta maior quantidade de queratina e melanina, o lábio, que possui uma fina camada de queratina, menor quantidade de melanina e menor secreção de glândulas sebáceas e sudoríparas, portanto é mais vulnerável aos efeitos nocivos da radiação (VIEIRA et al, 2012).

A QA caracteriza-se por alterações clínicas e histológicas clinicamente detectáveis como atrofia e ressecamento da semi-mucosa labial, escurecimento ou perda da nitidez da linha muco-cutânea, descamação constante e até a formação de áreas ulceradas (NEVILLE et al, 2009). Histologicamente exhibe epitélio de revestimento pavimentoso estratificado atrófico e/ou acantótico, normalmente hiperqueratótico e com graus variados de displasia epitelial. A lâmina própria mostra degeneração basofílica do colágeno induzida pela radiação UV e infiltrado de células inflamatórias crônicas em áreas adjacentes ao epitélio displásico (SILVERMAN, EVERSOLE, TRUELOVE, 2004; NEVILLE et al, 2009).



Assim como a QA, o CEL acomete, com maior frequência, homens de pele clara, com idade entre 50 e 70 anos e sua localização mais comum é em lábio inferior (ANTUNES, ANTUNES, 2004; REGEZI et al, 2012). As características clínicas desta enfermidade são variáveis, dependendo do estágio em que a lesão se encontra. As lesões em fase inicial de desenvolvimento aparecem sob a forma de uma úlcera crônica que não cicatriza ou como uma lesão exóftica que, ocasionalmente, possui uma natureza verrucosa (ANTUNES, ANTUNES, 2004; REGEZI et al, 2012; SILVA et al, 2006). Caracterizam-se, histologicamente, por ilhas ou cordões de células neoplásicas que, dependendo do grau de diferenciação, podem assemelhar-se ou não ao epitélio de origem, apresentando alterações na estratificação, pleomorfismo nuclear e celular, hiperchromatismo nuclear, mitoses atípicas, entre outras alterações. No estroma, observa-se tecido conjuntivo denso exibindo degeneração basofílica do colágeno e infiltrado inflamatório crônico variável (NEVILLE et al, 2009).

O desenvolvimento do câncer passa por múltiplas etapas, nas quais acontecem alterações genéticas progressivas em células que carregam oncogenes ativados ou genes supressores de tumor inativados, além de mudanças epigenéticas no microambiente onde o tumor se desenvolve (BISSEL, RADISSKY, 2001). Somadas, tais características, proporcionam às células neoplásicas habilidades fundamentais para o desenvolvimento neoplásico: crescimento autossuficiente, insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento, resistência à programação de diferenciação terminal, senescência ou apoptose; capacidade de auto-renovação celular ilimitada, de modulação da angiogênese e de invadir tecidos ectópicos localmente e à distância,

propriedade esta conhecida como metástases (HANAHAH, WEINBERG, 2011).

Não há dúvidas de que a capacidade de invadir os tecidos e de constituir colônias de células em sítios remotos é característica de neoplasia maligna. Como a transformação maligna e as metástases subsequentes são a principal causa de morte em pacientes com uma neoplasia maligna, compreender melhor os mecanismos de invasão neoplásica e metástases é invariavelmente essencial para a descoberta de novos alvos terapêuticos e, por conseguinte, para aumentar a sobrevida de pacientes portadores de câncer (KOWALSKI et al, 2005).

O prognóstico do CEL está relacionado com a atividade proliferativa do tumor, grau de diferenciação, capacidade de invasão e/ou potencial metastático (LARSEN et al, 2009). Os dois últimos processos envolvem muitos passos, dentre eles, a degradação da membrana basal (MB) e da matriz extracelular (MEC), alterações na adesão celular, motilidade de células tumorais e angiogênese (BARROS et al, 2011).

A invasão neoplásica é um processo dinâmico, complexo e com várias etapas, envolvendo a desagregação de células malignas do seu lugar de origem, levando essas células a atravessar a MB e a MEC, e adentrarem os canais linfo-vasculares. A proteólise dos componentes da MB e da MEC são passos fundamentais para invasão tecidual, assim, enzimas específicas capazes de degradar colágeno, laminina e fibronectina são requeridas para tal função. Neste contexto, as metaloproteinases de matriz (MMP), têm sido alvo de extensas pesquisas (LIN et al, 2006).

As MMPs são uma família de endopeptidases, enzimas proteolíticas dependentes de cálcio e zinco, que desempenham funções em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo aspectos do desenvolvimento embrionário, morfogênese do tecido, organogênese, doenças inflamatórias e câncer (STERNLICHT, WERB, 2001; VU, WERB, 2000; MCCAWLEY et al, 2004).

Ações fisiológicas das MMPs incluem crescimento neuronal, migração celular, alongamento ósseo, reparo de feridas, angiogênese, ovulação, maturação do esperma, involução uterina, menstruação, formação do esmalte, processamento e apresentação de antígeno, desenvolvimento de glândula mamária, desenvolvimento de folículo capilar, implantação embrionária (STERNLICHT, WERB, 2001; VU, WERB, 2000; MCCAWLEY et al, 2004).

Estas proteínas são sintetizadas e secretadas na forma de pró-enzimas ou zimogênios por fibroblastos, macrófagos, osteoblastos, neutrófilos, linfócitos, ceratinócitos e células neoplásicas. Necessitam de ativação no espaço extracelular, onde o segmento pró-peptídeo está ligado à porção N-terminal, que deve ser removida para manifestar sua ação enzimática. Sua expressão é regulada em vários níveis, incluindo a conversão da pró-enzima para forma ativada, regulação da transcrição, tradução, mecanismos de ativação extracelular e bloqueio de inibidores teciduais de MMPs; por citocinas, fatores de crescimento, interações entre células e entre células e matriz (MORRISON et al, 2009).

Estudos mostram que existem mais de 21 tipos de MMPs, subdivididas em MMPs associadas à membrana e em MMPs solúveis. As MMPs solúveis são classificadas em collagenases, gelatinases, estromelinas, metrilisinas (EGEBLAD, WERB, 2002; VILEN et al,

2013). As collagenases degradam colágeno intersticial tipo I; as gelatinases, colágenos previamente desnaturados; e as estromelinas: fibronectina, elastina e laminina (VU, WERB, 2000).

Entre as gelatinases, destacam-se as MMPs -2 e -9, que possuem habilidade em degradar colágenos presentes na MB, além de ajudarem as collagenases na degradação do interstício. A MMP-2 pode ativar a collagenase intersticial latente e esta cliva a  $\alpha$ -hélice dos colágenos tipo I, II, III, resultando em fragmentos que posteriormente são degradados pela MMP-2 e MMP-9 (HEIKKILA et al, 2006; ROEBUCK et al, 2005).

Em condições patológicas, a expressão das MMPs pode se apresentar alterada. Sob condições inflamatórias persistentes, por exemplo, um aumento na expressão dessas enzimas leva à degradação da MEC, favorecendo a migração, diferenciação e proliferação celular que ocorrem nos processos de reparo, angiogênese, invasão de células neoplásicas e metástases (BISSELL, RADISSKY, 2001; KUMAMOTO et al, 2003). Neste contexto, a QA é uma lesão potencialmente malignizável e que apresenta inflamação subepitelial persistente, mas se desconhece qual a influência dessa inflamação no processo de degeneração da MEC ou ainda se há o favorecimento da transformação, progressão ou invasão maligna (EHRIG et al, 2006).

Para a progressão das neoplasias malignas, é necessário que ocorra “comunicação” entre as células do parênquima neoplásico e as do estroma que as circunda, principalmente por meio de receptores transmembranares. Tal interação promove a angiogênese, inflamação, invasão e remodelagem da MEC por meio da interação célula-célula e da produção de fatores de crescimento, hormônios, citocinas e

proteínases como as MMPs (MAREEL, OLIVEIRA, MADANI, 2009; PIETRAS, OSTMAN, 2010). Neste ínterim, sabe-se que as MMPs degradam com eficiência o colágeno do tipo IV, principal componente das membranas basais, bem como outros componentes da MEC, e assim propiciam a invasão das estruturas adjacentes pelas células malignas, um evento chave na progressão neoplásica (STETLER-STEVERSON, AZNAVOORIAN, LIOTTA, 1993; VILEN, et al, 2013).

As gelatinases (MMP -2 e -9), tem sido alvo de muitos estudos por estarem correlacionadas com a progressão de neoplasias malignas (BJORKLUNDO, KOIVUNEN, 2005). Impola et al (2004) e Sutinen et al (1998) encontraram um aumento da expressão de MMP-9 em células neoplásicas e em células inflamatórias em torno das ilhas do CE bucal além de expressão de MMP-2 principalmente em fibroblastos associados à neoplasia. Segundo Ikebe et al (1999), o aumento da expressão das MMPs -2 e -9 em CE bucais pode ser relacionado com a capacidade aumentada de invasão, mas não com o potencial metastático.

Atualmente, decisões terapêuticas para o tratamento de CE fundamentam-se em parâmetros clínicos e patológicos, incluindo: idade, metástase, fase e o grau histológico do tumor. Contudo, estes fatores não distinguem de maneira precisa entre um tumor mais ou menos agressivo. Por isso, a identificação de marcadores específicos, como as MMPs, enzimas abundantemente expressas em várias neoplasias malignas e relacionadas em todas as fases de progressão neoplásica, permitiria o estabelecimento de estratégias terapêuticas mais eficientes, contra antígenos específicos (BARROS et al, 2011).

Diante da importância do tema e da escassez de estudos direcionados, este trabalho visou estudar a expressão das MMPs -2 e -9

na QA e no CEL, a fim de compreender a sua influência na transformação maligna da QA em CEL e na progressão do CEL.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar a presença imuno-histoquímica das MMPs-2 e -9 em 20 casos de QA e 20 CEL diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC) em comparação com 20 fragmentos de mucosa labial normal (MLN) obtidas por meio de biópsias de mucocelos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Promover o levantamento de 20 casos de QA e 20 casos de CEL e 20 MLN diagnosticados no LPB-UFSC;
- Avaliar a expressão imuno-histoquímica das MMPs -2 e -9 em QAs, CEL e MLN, evidenciando a localização e a intensidade de marcação;
- Comparar a imunoexpressão das MMPs em estudo entre as QAs, CELs e MLNs;
- Estabelecer possíveis correlações entre a expressão das MMPs nas lesões de QA, CEL e MLN;
- Comparar os resultados obtidos com a literatura.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Delineamento do estudo**

O estudo proposto é do tipo observacional descritivo, retrospectivo.

#### **3.2 Aspectos Éticos**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina sob o parecer 301.461, CAAE: 16963413.3.0000.0121 (ANEXO A).

#### **3.3 Seleção do material de estudo**

A seleção dos casos foi feita a partir dos arquivos do LPB-UFSC. Foram selecionados 20 casos de QA, 20 casos de CEL e 20 casos de MLN de pacientes com idade superior a 18 anos pertencentes aos arquivos do LPB/UFSC e suas lâminas coradas em HE foram revisadas por 3 patologistas experientes.

#### **3.4 Procedimentos Laboratoriais**

Os procedimentos da técnica de imuno-histoquímica foram executados no LPB/UFSC. Foram realizadas reações de imuno-histoquímica pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase, para avaliação dos antígenos MMP-2 e MMP-9. Para cada amostra foram obtidos cortes seriados de 3µm de espessura dos blocos de parafina, que foram distendidas em lâminas silanizadas (Zymed



Laboratories, Inc. San Francisco, CA, USA) e levados à estufa a 60°C por 15 minutos.

Em seguida os cortes sofreram desparafinização em xilol e foram reidratados em uma sequência decrescente de etanol e, posteriormente, foram lavados em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena deu-se em soluções que tinham na sua composição: tampão Phosphate-buffered saline (PBS), álcool metílico e peróxido de hidrogênio.

Para a recuperação dos sítios antigênicos realizou-se o tratamento dos cortes teciduais com tampão citrato 0,01M pH 6,0 em banho-maria a 96°C por 40 minutos. O bloqueio de ligações inespecíficas ocorreu por meio da incubação com leite em pó desnatado (5% em solução tampão PBS), à temperatura ambiente, por 40 minutos, seguida de lavagem com água destilada. A seguir os cortes foram incubados com anticorpos primários anti-MMP-2 [1:50] (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, EUA) e anti-MMP-9 [1:250] (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, EUA), a 4°C, overnight.

Após o tempo de incubação do anticorpo primário os cortes foram submetidos a dois banhos de PBS e incubados com o anticorpo secundário Kit LSAB (DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA). A revelação da reação ocorreu com o cromógeno diaminobenzidina (DAB+Substrate Chromogen System®, DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA), por 2 minutos. Após lavagem em água destilada, os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Harris, pelo tempo de 2,5 minutos, posteriormente, lavados em água. Em seguida, removeu-se o pigmento formólico por meio de uma rápida imersão em solução aquosa de hidróxido de amônia 1% e, imediatamente, os cortes foram lavados em água corrente.

A desidratação deu-se por uma sequência crescente de banhos em etanol e para a diafanização, as lâminas foram imersas em dois banhos de vinte minutos em xilol. Espécimes de medula óssea para MMP-9 e carcinoma de mama para MMP-2 foram utilizados como controle positivo da imunorreatividade em cada reação. Como controle negativo, os anticorpos

primários foram omitidos da sequência da reação. Por fim, as lâminas foram montadas utilizando-se Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) e submetidas à secagem em estufa a 40°C por, no mínimo, 24 horas.

### **3.5 Avaliação da Imunorreatividade**

As lâminas tiveram sua identificação mascarada de forma que a captura das imagens e a análise da imunorreatividade foi feita por um examinador às cegas previamente calibrado quanto ao grupo a que cada lâmina pertencia. Foram capturados cinco campos equidistantes de cada lâmina, em aumento de 400x por meio de microscópio óptico binocular (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), acoplado a um sistema de aquisição de imagem digital (A620, Cannon, Lake Success, NY, USA), e a um microcomputador (HP Compaq 6005, São Paulo, Brasil), onde foram armazenadas as imagens.

Os valores foram registrados em uma planilha do Microsoft Excel®. Para avaliação, utilizou-se o software para análise de imagens digitalizadas "ImageJ" versão 1.48 (National Institute of Health, Bethesda, EUA). As células coradas em marrom (células positivas) e em azul (células negativas) foram contados e a média dos cinco campos de cada caso foi calculada.

Além disso, foi feita a observação morfológica dessa marcação, que mostrou um padrão de divisão do epitélio em terço basal, terço médio e terço superior. No caso específico dos CEL, é importante ressaltar que o terço basal incluía as áreas de invasão nos casos em que o epitélio neoplásico ainda permanecia revestindo a mucosa e a zona periférica das ilhas e cordões de epitélio neoplásico naqueles casos em que a invasão já havia acontecido.

Foram classificadas conforme a intensidade segundo os seguintes critérios: fracamente positivo (+), menos de 10% das células positivas; fortemente positivo (+++), mais de 50% das células positivas; expressão moderada, mais que 10% e menos que 50%; ausente, positividade inferior a 10% (BARROS et al, 2011).

Com isso, determinou-se a proporção das células positivas para cada amostra, expressa em porcentagem.

### **3.6 Análise dos dados**

A comparação da proporção de células positivas foi realizada entre todos os grupos e subgrupos, por meio da análise de variância (ANOVA) seguida pelo T-student. Consideraram-se significantes valores de  $p < 0,05$ . Todos os dados coletados foram organizados em planilha eletrônica e posteriormente analisados no software SPSS® versão 11 (SPSS Inc., Headquarters, EUA).

#### 4. RESULTADOS

Este trabalho estudou a expressão imuno-histoquímica das enzimas MMP-2 e MMP-9 no epitélio de 20 casos de QA e 20 casos de MLN e no epitélio neoplásico de 20 casos de CEL pelo método estreptavidina-biotina-peroxidase.

Os casos diagnosticados como MLN são oriundos de biópsias de mucocele. Os casos de QA apresentavam revestimento epitelial ora acantótico, ora atrófico. A lâmina própria dos casos de QA exibiram graus variados de degeneração basofílica do colágeno e inflamação.

Os casos de CEL estudados foram compostos tanto por lesões em que o epitélio neoplásico ainda permanecia revestindo a mucosa, como por casos em que a úlcera estava consolidada e a maior parte do epitélio transformado encontrava-se disposto em ilhas e cordões que invadiam o tecido conjuntivo adjacente.

Em cada um dos casos, independentemente do diagnóstico, foram fotografados 5 campos equidistantes e contados os citoplasmas positivos, além do total de células do campo, sendo os resultados apresentados na forma de “Média ( $\pm$  Desvio padrão)”.

Os resultados estão apresentados nas tabelas abaixo.

Enzima			MLN	QA	CEL
MMP-2	Terço basal	Citoplasma	++	-/+ / ++	-/+ / ++
	Terço médio	Citoplasma	- / +	- / +	-
	Terço superior	Citoplasma	-	-	-
MMP-9	Terço basal	Citoplasma	- / +	- / + / ++	- / +
	Terço médio	Citoplasma	- / +	- / +	-
	Terço superior	Citoplasma	-	-	-

Tabela 1. Intensidade da imunomarcção para as MMPs nas lesões estudadas. - ausência de marcação, + marcação fraca, ++ marcação moderada, +++ marcação fortemente positiva.

Enzima		MLN	QA	CEL	*p
<b>MMP-2</b>	Citoplasma	60,06%	53,96%	43,85%	p=0,23
	%	(±31,67)	(±21,57)*	(±25,09)*	
<b>MMP-9</b>	Citoplasma	35,87%	54,21%	27,74%	p=0,06
	%	(±5,78)	(±31,17)*	(±22,40)*	

Tabela 2. Porcentagem de imunomarcação para as MMPs nas lesões estudadas com desvio padrão.

#### 4.1 MMP-2

Nos casos de QA estudados a marcação mostrou um padrão de divisão do epitélio em terços. Na maioria dos casos no terço basal a marcação citoplasmática foi moderada (++), com alguns casos de fraca a ausente (-/+). No terço médio foi de fraca a ausente (-/+) e no terço superior ausente (-) (Fig. 1a).

A expressão da MMP-2 nos CEL mostrou variação em distribuição e intensidade, principalmente quando se compara o terço basal (periférico) com os outros terços do epitélio neoplásico. Assim sendo, observou-se um padrão de marcação no terço basal de fraca a ausente (-/+), mas em algumas áreas, marcação moderada (++). Já nos terços médio e superior, na maioria dos casos, não houve marcação citoplasmática (-) (Fig. 1b).

A observação morfológica da marcação para a MMP-2 no epitélio de revestimento da MLN também mostrou um padrão de divisão deste tecido em terço basal, terço médio e terço superior. Na maioria dos casos estudados a marcação citoplasmática foi moderada (++) no terço basal, sendo que a marcação citoplasmática tornava-se ausente ou fraca (-/+) no terço médio e ausente no terço superior (-) (Fig. 1c). Observou-se marcação nuclear escassa de MMP-2 em alguns casos de QA, CEL e MLN.

Além disso, a enzima MMP-2 apresentou imunomarcação citoplasmática em 53,96% (±21,57%) das células das QA, 43,85% (±25,09%) das células dos CEL e 60,06 % (±31,67%) das células epiteliais das MLN sem

diferença estatisticamente significativa entre a MLN/QA ( $p=0,65$ ), MLN/CEL ( $p=0,46$ ) e entre QA/CEL ( $p=0,23$ ).

## 4.2 MMP- 9

Nos casos de QA estudados a marcação citoplasmática mostrou um padrão de divisão entre os terços; sendo, na maioria dos casos no terço basal de fraca à moderada (+/++), ou negativa em alguns casos (-). No terço médio foi ausente ou fraca (-/+) e no terço superior ausente (-). (Fig. 1d)

A expressão da MMP-9 nos CELs foi relativamente fraca. No terço basal (periférico), na maioria dos casos foi negativa, e em alguns outros, fracamente positivo (-/+). Nos terços médio e superior foi ausente (-). (Fig. 1e)

A marcação para a MMP-9 no epitélio de revestimento das MLN também mostrou um padrão de divisão deste tecido entre os terços. Na maioria dos casos estudados a marcação citoplasmática foi fraca ou negativa (-/+) no terço basal, mantinha-se o mesmo padrão no terço médio, com a maioria negativa (-) e em alguns casos fraca (+), e sem marcação no terço superior (-) (Fig. 1f). Observou-se marcação nuclear escassa de MMP-9 em alguns casos de QA, CEL E MLN.

Ainda, a enzima MMP-9 apresentou imunomarcação citoplasmática em 54,21% ( $\pm 31,17\%$ ) das células das QA e 27,74% ( $\pm 22,40\%$ ) das células dos CEL e 35,87 % ( $\pm 5,78\%$ ) das células epiteliais das MLN, sem diferença estatisticamente significativa entre a MLN/QA ( $p=0,08$ ), MLN/CEL ( $p=0,96$ ) e entre QA/CEL ( $p=0,06$ ).

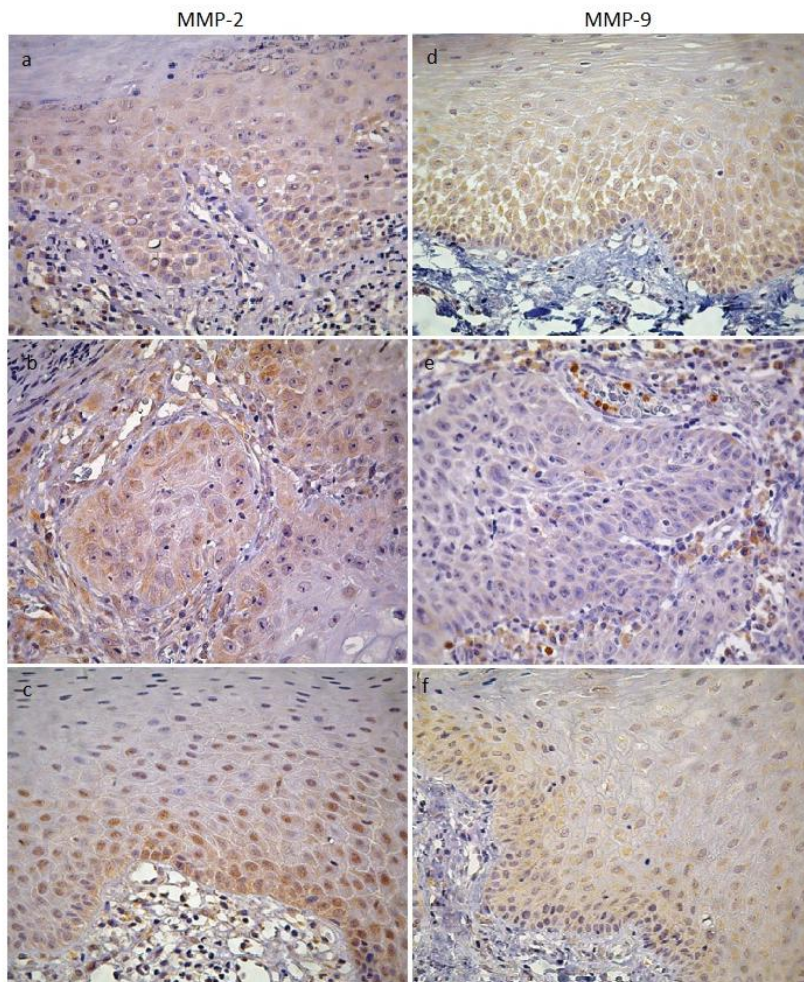


FIGURA 1 – Expressão imuno-histoquímica das MMPs em QA, CEL e MLN (400x). (a) Expressão de MMP-2 em QA de moderada a fraca no terço basal. (b) Expressão de MMP-2 em CEL principalmente na basal das ilhas neoplásicas. (c) Expressão de MMP-2 moderada a fraca na basal em MLN. (d) Expressão de MMP-9 em QA, fraca a moderada no terço basal. (e) Expressão de MMP-9 em CEL negativa com áreas fracamente positivas. (f) Expressão de MMP-9 em MLN fracamente positiva.

## 5. DISCUSSÃO

As MMPs são uma família de proteases normalmente expressas em neoplasias invasivas e no estroma adjacente e acredita-se que elas desempenhem um papel importante na invasão neoplásica e metástases (LIN et al, 2006, VICENTE et al, 2005). Um carcinoma desenvolve-se a partir do epitélio, estando inicialmente confinado pela MB, sendo chamado neste momento de carcinoma *in situ*. A MB tem vários componentes, entre eles: laminina, colágeno tipo IV, proteoglicanos; e sua degradação é um elemento crucial para a progressão do carcinoma *in situ* para o CE invasivo (MAREEL, OLIVEIRA, MADANI, 2009). As células neoplásicas penetram inicialmente a MB e em seguida o tecido conjuntivo da lâmina própria, por isso, a proteólise da MEC é um passo essencial na invasão (PIETRAS, OSTMAN, 2010). As células cancerígenas produzem diferentes enzimas que degradam a MEC, como as MMPs, as catepsinas e as ativadoras de plasminogênio, e considera-se que todas elas desempenhem um papel no comportamento maligno das neoplasias (VICENTE et al, 2005).

Neste estudo, avaliou-se a expressão das enzimas MMP-2 e 9 em CEL, uma neoplasia maligna derivada de queratinócitos e de comportamento invasivo, como também em QA, uma lesão benigna que tem o potencial de se transformar em CEL. Como parâmetro de comparação, avaliou-se também a expressão das mesmas enzimas em epitélio normal oriundo de fragmentos de lábio presente em amostras de mucoccele.

Alguns trabalhos investigaram o papel das gelatinases em CE orais e demonstraram relação entre a expressão de MMP-2 e 9 e a agressividade da neoplasia, afirmando a importância da utilização de MMPs como marcadores prognósticos ou para fins terapêuticos (KATO et al, 2005; VICENTE et al 2005). No entanto outros estudos não foram capazes de confirmar esses resultados (KORPI et al, 2008; FRANCHI et al, 2002).



Yorioka et al. (2002) sugeriram que as células neoplásicas estimulam a expressão de MMPs a fim de favorecer a degradação proteolítica da MEC. No estudo de Barros et al. (2011), a expressão MMPs sugere que estas desempenhem um papel eficaz no desenvolvimento de CEs orais por estarem envolvidas nos estágios iniciais de desenvolvimento dos mesmos, desde a clivagem da MB, por meio da degradação do colágeno tipo IV (substratos preferenciais de MMP-2 e -9), fato que ajudaria a explicar os resultados aqui encontrados, onde a maior expressão de MMP-2 e -9 na aconteceu na lesão pré-maligna (QA) em comparação com o CEL.

Segundo o estudo de Poswar et al. (2014) a MMP-2 foi expressa em níveis semelhantes tanto em lesões de queratose actínica (contrapartida da QA em pele) quanto em CE de pele. De forma semelhante, neste estudo, não houve significancia estatística na comparação entre a expressão de MMP-2 em QA e CEL. Isso pode ser explicado devido ao fato de que os mecanismos moleculares de regulação do MMP-2 estejam ativados em ambos os tipos de lesão (POSWAR et al, 2014) e ao potencial de progressão das lesões de QA para CEL.

Sutinen et al. (1998), mostrou a marcação para MMP-2 nas células epiteliais periféricas das ilhas neoplásicas de CE oral, fato condizente com o nosso estudo. Imanishi et al. (2000), observaram que a imunopositividade para MMP-2 foi localizada predominantemente nas células do CE oral mas também em células estromais. Katayama et al. (2004), verificaram que a MMP-2 e -9 foram expressas principalmente em células tumorais mas também em algumas células endoteliais e nos fibroblastos estromais ao redor das células neoplásicas do CE oral.

Segundo a pesquisa realizada por Barros et al. (2011), na análise quantitativa, houve uma maior expressão de MMPs em CE de língua em comparação com CEL, no entanto essa diferença foi estatisticamente relevante somente para a MMP-9. Ainda, a MMP-2 mostrou-se com expressão fraca a

moderada em CEL, já a expressão da MMP-9 foi de fraca ou nenhuma para 94% casos de CEL.

Além disso, neste mesmo estudo Barros et al (2011), foi constatou que as células do estroma em casos de CE orais foram capazes de produzir MMPs e acredita-se que estas enzimas estromais potencializem a ação das enzimas produzidas pelo parênquima, dando fundamento a hipótese de uma provável interação entre as células neoplásicas e o estroma adjacente. Esta interação permitiria que as células neoplásicas do parênquima induzissem as células do estroma para que com a ajuda delas fossem produzidas mais enzimas proteolíticas, desse modo, favorecendo os processos de invasão, migração e metástase. Relacionado a isso, está o fato das MMPs, no presente estudo, estarem com sua expressão mais relevante na terço basal do epitélio, tanto na QA, quanto no CEC, ou seja, na interface com o estroma.

Segundo Vicente et al. (2005), houve significância estatística a relação entre o grau histológico de malignidade dos CE orais e a expressão imuno-histoquímica para MMP-9, sendo que a expressão foi maior nas lesões bem diferenciadas; mas, não para MMP-2. Já, Liu et al. (2005), observou associação significativa entre a imunolocalização das gelatinases e o grau de diferenciação das células em CE de laringe. Hernandez-Perez et al. (2012), ao comparar a expressão de MMP-9 em CE de pele de graduações diferentes, não encontrou nenhuma relação de significância entre diferenciação do CE e expressão de MMP-9. Ainda, uma menor expressão de MMP-9 foi descrita em CE altamente invasivos quando comparado com o CE microinvasivo (VERDOLINE et al, 2001). Analisados em conjunto, estes resultados sugerem que a expressão de MMP-9 possa ser mais importante nos estágio iniciais da carcinogênese. Em nosso estudo, ambas as gelatinases foram mais expressas na lesão pré-maligna.

Sabe-se que a mucoccele é uma lesão inflamatória que tem como etiologia o trauma , com isso há liberação de citocinas inflamatórias, tais como: interleucina-1 e 6, fator de necrose tumoral-alfa (TNF-  $\alpha$  ), podendo estimular os queratinócitos. Com a ruptura do ducto salivar intra-dérmico, o muco que

extravasa ativa os macrófagos, estes secretam ainda mais  $\text{TNF-}\alpha$ , responsável pelo recrutamento de neutrófilos, resultando em uma subsequente resposta inflamatória. Além disso, ocorre a estimulação dos fibroblastos a produzirem MMP-2 e -9 (LEE, CHO, PARK, 2009). Lee et al. (2009), em um estudo imuno-histoquímico com mucocelos, observaram a expressão de MMP-2 em 62 a 78% dos casos de mucocelo; para MMP-9, este número foi de 89 a 100%. Acredita-se que a utilização de biópsia de mucosa labial normal seria um controle mais fidedigno; no entanto, essa possibilidade foi inviável em nosso estudo, por isso a utilização das lesões de mucocelo para tal fim.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo demonstraram maior expressão das MMPs em QA quando comparado ao CEL. Apesar da ausência de significância estatística, as diferenças encontradas podem indicar a participação dessas enzimas em eventos que possam estar envolvidos com o estabelecimento inicial da neoplasia, na fase onde a lesão pré-maligna passa a ser maligna. Para entender de forma aprofundada o papel das gelatinases no comportamento de tais lesões, essas enzimas devem ser alvo de estudos futuros objetivando confirmar ou não estes resultados.

## REFERÊNCIAS

ANTUNES, A. A.; ANTUNES, A. P.; Estudo retrospectivo e revisão de literatura dos tumores dos lábios: experiência de 28 anos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.50, n.4, p.295-300, 2004.

BARROS, S. S. L. V.; HENRIQUES, A. C. G.; PEREIRA, K. M. A.; MEDEIROS, A. M. C.; GALVÃO, H. C.; FREITAS, R. A. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. **Archives of Oral Biology**, v.56, p.752-760, 2011.

BISSELL, M. J.; RADISSKY, D. Putting tumours in context. **Nature Rev. Cancer**, v.1, p.46–54, 2001.

BJORKLUND, M.; KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1755, n. 1, p.37–69, 2005.

CURY, P. R.; FURUSE, C.; ARAUJO, N. S.; ARAUJO, V. C. Signal transducer and activator of transcription-3 expression and activation is dysregulated in actinic cheilitis. **Journal of cutaneous pathology**, v.54, p.606-611, 2007.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**. v. 2, p.161-74, 2002.

EHRIG, T.; COCKERELL, C.; PIACQUADIO, D.; DROMGOOLE, S. Actinic Keratoses and the Incidence of Occult Squamous Cell Carcinoma: A Clinical–Histopathologic Correlation. **Dermatologic Surgery**, v. 32, n.10, p.1261-1265, 2006.

FRANCHI, A.; SANTUCCI, M.; MASINI, E.; SARDI, I.; PAGLIERANI, M.; GALLO, O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of head and neck. **Cancer**, v.95, n.9, p 1902-1910, 2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, n.5, p.646-674, 2011.

HEIKKILA, P.; SUOJANEN, J.; PIRILA, E.; VAANANEN, A.; KOIVUNEN, E.; SORSA, T.; SALO, T. Human tongue carcinoma growth is inhibited by selective antigelatinolytic peptides. **Int J Cancer**, v.118, n.9, p.2202-9, 2006.

HERNANDEZ-PEREZ, A.; EL-HAJAHMAD, M.; MASSARO, J.; MAHALINGAM, M. Expression of gelatinases (MMP-2, MMP-9) and gelatinase activator (MMP-14) in actinic keratosis and in situ and invasive squamous cell carcinoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.34, n.7, p. 723-728, 2012.

IKEBE, T.; SHINOHARA, M.; TAKUCHI, H.; BEPPU, M.; KURAHARA, S.; NAKAMURA, S.; SHIRASINA, K. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 17, n. 4, p.315–323, 1999.

IMANICHI, Y.; FUJII, M.; TOKUMARU, Y.; TOMITA, T.; KANKE, M.; KANZAKI, J.; KAMEYAMA, K.; OTANI, Y.; SATO, H. Clinical significance of expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 in human head and neck squamous cell carcinoma. **Human Pathology**, v.31, n.8, p 895-904, 2000.

IMPOLA, U.; UITTOL, V. J.; HIETANEN, J.; HAKKINEN, L.; ZHANG, L.; LARJVA, H.; ISAKA, K.; SAARIALHO-KERE, U. Differential expression of matrilysin-I (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. **Journal of Pathology**, v.202, n.1, p.14–22, 2004.

KATAYAMA, A.; BANDO, N.; KISHIBE, K. TAKAHARA, M.; OGINO, T.; NONAKA, S.; HARABUCHI, Y. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastasis and prognosis. **Clinical Cancer Research**, v.10, n.2, p. 634-640, 2004.

KATO, K.; HARA, A.; KUNO, T.; KITAORI, N.; MORI, H.; TOIDA, M.; SHIBATA, T. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in oral squamous cell carcinomas: manifestation and localization of their activity. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.131, n.6, p. 340-346, 2005.

KAUGARS, G. E.; PILLION, T.; SVIRSKY, J. A.; PAGE, D. G.; BURNS, J. C.; ABBEY, L. M. Actinic cheilitis – A review of 152 cases. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics**, v.88, p.181-186, 1999.

KORNEVS, E.; SKAGERS, A.; TARS, J.; BIGESTANS, A.; LAUSKIS, G.; IBERMANIS, O. Five years experience with lower lip cancer. **Stomatologija, Sofiia**, v.7, p.95-98, 2005.

KORPI, J.T.; KERVINEN, V.; MAKLIN, H.; VAANANEN, A.; LAHTINEN, M.; LAARA, E.; RISTIMAKI, A.; THOMAS, G.; YLIPALOSAARI, M.; ASTROM, P.; LOPEZ-OTIN, C.; SORSA, T.; KANTOLA, S.; PIRILA, E.; SALO, T. Collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) plays a protective role in tongue cancer. **British Journal of Cancer**, v.98, n.4, p. 766-775, 2008.

KOVALSKI, L. P.; CARVALHO, A.L.; PRIANTE, A. V. M.; MAGRIN, J. Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v.41, n.5, p.534-41, 2005.

KUMAMOTO, H.; YAMAUCHI, K.; YOCHIDA, M.; OOYA, K. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.32, n.2, p.114-120, 2003.

LARSEN, S.R.; JOHAANSEN, J. ; SORENSEN, A.; KROGADAHN, A. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. **Journal of oral Pathology & Medicine**, v.38, n.8, p.657-662, 2009.

LEE, E.; CHO, S.H.; JONG, C. Clinical and immunohistochemical characteristics of mucocoeles. **Annals of Dermatology**, v.21, n.4, 2009.

LIN, M.H.; LIU S.Y.; SU H.J.; LIU, Y.C. Functional role of matrix metalloproteinase-28 in the oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v.42, n.9, p. 907-13, 2006.

LIU, W.W.; ZENG, Z.Y.; WU, Q.L.; HOU, J.H.; CHEN, Y.Y. Overexpression of MMP-2 in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis. **Otolaryngol Head neck Surg**, v.132, n.3, p. 395-400, 2005.

MARTINEZ, A.; BRETHAUER, I. G.; ROJAS, M.; SPENCER, F.; MUCIENTES, J.; BORLANDO, M. I.; RUDOLPH. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.34, n.5, p. 257-262, 2005.

MCCAWLEY, L. J.; CRAWFORD, H. C.; KING, L. E. J.; MUDGETT, J.; MATRISIAN, L. M. A protective role for matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma. **The journal of Cancer Research**, v.64, n.19, p. 6965-69872, 2004.

MAREEL, M.; OLIVEIRA, M.J.; MADANI, I. Cancer invasion and metastasis: interacting ecosystems. **Virchows Archiv**, v.454, pg. 599-622, 2009.

MORRISON, C. J.; BUTLER, G. S.; RODRÍGUEZ, D.; OVERALL, C. M. Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 5, p. 645-653, 2009.

NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M.; BOUQUOT, J. E. **Patologia oral e maxilofacial**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

OUHTIT, A.; MULLER, H. K.; DAVIS, D. W.; ULLRICH, S. E.; McCONKEY, D.; ANANTHATWAMY, H. N. Temporal Events in Skin Injury and the Early adaptive Responses in Ultraviolet-Irradiated Mouse Skin. **Journal of Pathology**, v.156, n.1, p. 201-207, 2000.

PIETRAS, K.; OSTMAN, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p.1324–1331, 2010.



POSWAR, F.O.; FRAGA, C.A.C.; GOMES, E.S.; FARIAS, L.C.; SOUZA, L.W.; SANTOS, S.H.; GOMEZ, R.S.; DE-PAULA, A.M.; GUIMARÃES, A.L. Protein expression of MMP-2 and MTI-MMP in actinic keratosis, squamous cell carcinoma of the skin, and basal cell carcinoma. **International Journal of Surgical Pathology**, 06/2014.

PRADO, B. N.; PASSARELLI, D. H. C. Uma nova visão sobre prevenção do câncer bucal no consultório odontológico. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v.21, n.1, p.79-85, 2009.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN, R. C. K. **Patologia oral: correlações clinicopatológicas**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.51-75, 2012.

ROEBUCK, M.M.; HELLIWELL, T.B.; CHAUDHRY, I.H.; KALOGRIANITIS, S.; CARTER, S.; KEMP, G.J.; RITCHIE, D.A.; JANE, M.J.; FROSTICK, S.P. Matrix metalloproteinase expression is related to angiogenesis and histologic grade in spindle cell soft tissue neoplasms of the extremities. **American Society for Clinical Pathology**, v.123, n.3, p.405-414, 2005.

SANTOS, J. N.; SOUSA, S. O. M.; NUNES, F. D.; SOTTO, M. N.; ARAUJO, V. C. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. **Journal of cutaneous pathology**, v. 30, n.4, p.237-241, 2003.

SENA, M. F. de; COSTA, A. P. S. da; NÓBREGA, A. G. S. da; FERREIRA, A. A. F.; COSTA, A. de L. L. Avaliação dos Fatores Prognósticos Relacionados ao Câncer de Lábio: Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.56, n.1, p.93-102, 2010.

SILVA, F.D da; DANIEL, F. I.; GRANDO, J. L.; CALVO, M. C.; RATH, I. B. da; FABRO, S. M. L. Estudo da prevalência de alterações labiais em pescadores da ilha de Santa Catarina. **Revista Odonto Ciência** – Faculdade de Odontologia/PUCRS, v.21, p. 37-42, 2006.

SILVERMAN, S.; EVERSOLE, L. R.; TRUELOVE, E. L. **Fundamentos de medicina oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

STETLER-STEVENSON, W. G.; AZNAVOORIAN, S.; LIOTTA, A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. **Annual Review of Cell Biology**, v. 9, p. 541–573, 1993.

STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Rev. Cell Dev. Biol.**, v.17, pg. 463-516, 2001.

SUTINEN, M.; KAINULAINEN, T.; HURSKAINEN, T.; VESTERLUND, E.; ALEXANDER, J. P.; OVERALL, C. M.; SORSA, T.; SALO, T. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. **Br Journal Cancer**, v. 77, n. 12, p. 2239–2245, 1998.

VERDOLINI, R.; AMERIO, P.; GOTERI, G.; BUGATTI, L.; LUCARINI, G.; MANNELLO, B.; FILOSA, G.; OFFIDANI, A.; BRANCORSINI, D.; BIAGINI, G.; GIANGIACOMI, M. Cutaneous carcinomas and preinvasive neoplastic lesions. Role of MMP-2 and MMP-9 metalloproteinases in neoplastic invasion and their relationship with proliferative activity and p53 expression. **Journal of Cutaneous Pathology**, v.28, n.3, p. 120-126, 2001.

VICENTE, J. C.; FRESNO, M. F.; VILLALAIN, L.; VEJA, J. A. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v.41, n.3, p.283-293, 2005.

VILEN, S. T.; SALO, T.; SORSA, T.; NYBERG, P. Fluctuating Roles of Matrix Metalloproteinase-9 in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Scientific World Journal**, 2013.

VIEIRA, R. A. M. A. R.; MINICUCCI, E. M.; MARQUES, M. E. A.; MARQUES, S.A. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An. Bras, Dermatol**, v. 87, n. 1, 2012.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev.**, v.14, p.2123–2133, 2000.

YORIOKA, C. W.; COLETTA, R. D.; ALVES, F.; NISHIMOTO, I.N.; KOWALSKI, L.P.; GRANER, E. Matrix metalloproteinase-2 and 9 activities corralate with the disease-free survival of oral squamoues cell carcionoma patients. **International Journal of Oncology**, v.20, n.1, p. 189-194, 2002.

|

## ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ -2 E -9 EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LÁBIO

**Pesquisador:** Filipe Modolo

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 16963413.3.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 301.461

**Data da Relatoria:** 10/06/2013

#### Apresentação do Projeto:

"AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ -2 E -9 EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LÁBIO". Projeto que visa estudar a presença das MMPs -2 e -9 na queilite actínica (QA), uma lesão potencialmente malignizável, ou seja, que apresenta um risco aumentado de apresentar crescimento celular desordenado e transformação em câncer. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas dependentes de cálcio e zinco, que desempenham funções em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo aspectos do desenvolvimento embrionário, morfogênese do tecido, reparo de feridas, doenças inflamatórias e câncer. Em condições patológicas a expressão das MMPs pode apresentar-se alterada.

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo primário é investigar o papel das metaloproteinases de matriz (MMPs) -2 e -9 no comportamento biológico de 30 casos de QA e 30 casos de CEL diagnosticados no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC) em comparação com 20 casos de mucosa labial normal (MLN) oriundos de biópsias de mucocele.

Secundariamente: - promover o levantamento de 30 casos de QA e 30 casos de CEL diagnosticados no (LPB-UFSC); - avaliar a expressão imunoistoquímica das proteinases de matriz.

**Endereço:** Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima

**Bairro:** Trindade

**CEP:** 88.040-900

**UF:** SC

**Município:** FLORIANÓPOLIS

**Telefone:** (48)3721-9206

**Fax:** (48)3721-9696

**E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC

Continuação do Parecer: 301.461

do MMPs -2 e -9 em QAs, evidenciando a localização e a intensidade de marcação; -avaliar a expressão imunoistoquímica das MMPs -2 e -9 em CELs, evidenciando a localização e a intensidade de marcação; - avaliar a expressão do carcinoma epidermóide de lábio (CEL) uma enfermidade de grande importância no Brasil, um país tropical com elevada incidência de radiação ultravioleta (UV), onde a população sofre constante exposição solar tanto na área rural quanto urbana, devido principalmente à sua ocupação profissional.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores não existe risco para os sujeitos da pesquisa, uma vez que o estudo será executado em material anteriormente biopsado e armazenado no Laboratório; e como benefícios indireto, um melhor entendimento das doenças pesquisadas, levando a melhorias na prevenção, tratamento e prognóstico.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata o presente de um Projeto de pesquisa PIBIC/UFSC de uma aluna do Curso de Odontologia da UFSC. A seleção dos casos será feita a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal (LPB) da UFSC, onde serão selecionados ao menos 30 casos de queilite actínica, 30 casos de carcinoma epidermóide de lábio e 20 casos de MLN de pacientes com idade superior a 18 anos que tiveram estes diagnósticos a partir dos serviços do LPB que autorizarem o uso do material através da assinatura do TCLE. Os procedimentos para a realização da técnica de imunoistoquímica serão realizados no Laboratório de Patologia Bucal da UFSC. Projeto bem estruturado, documentação completa, TCLE de fácil compreensão aos participantes da pesquisa, estando portanto, de acordo com a Resolução nº196/96 e normas complementares. Recomendamos a sua aprovação.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Documentação completa.

**Recomendações:**

O CEPISH/UFSC recomenda que os pesquisadores iniciem a criação de um Biobanco.  
Consultar a Resolução nº441.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplica.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-900

UF: SC

Município: FLÓRIANÓPOLIS

Telefone: (48)3721-9206

Fax: (48)3721-9696

E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 301.461

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

FLORIANOPOLIS, 11 de Junho de 2013

---

**Assinador por:**  
**Washington Portela de Souza**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima

**Bairro:** Trindade

**CEP:** 88.040-900

**UF:** SC

**Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3721-9206

**Fax:** (48)3721-9696

**E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br





